

(19)日本国特許庁 (JP)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-206765

(43)公開日 平成7年(1995)8月8日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 C 65/40 69/94		9356-4H		
// A 61 K 31/19 31/235	A D U	9454-4C 9454-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平5-333132

(22)出願日 平成5年(1993)12月27日

(71)出願人 591120284
中国医学科学院药物研究所
中華人民共和国北京市宣武区先農壇街1号
(71)出願人 000002819
大正製薬株式会社
東京都豊島区高田3丁目24番1号
(72)発明者 郭 宗儒
中華人民共和国北京市宣武区先農壇街1号
中国医学科学院药物研究所内
(72)発明者 韓 錠
中華人民共和国北京市宣武区先農壇街1号
中国医学科学院药物研究所内
(74)代理人 弁理士 北川 富造

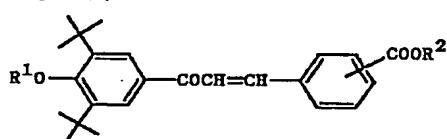
最終頁に続く

(54)【発明の名称】安息香酸誘導体

(57)【要約】

【目的】従来に比べ優れた抗腫瘍作用および分化誘導作用を有する化合物を提供すること。

【構成】式

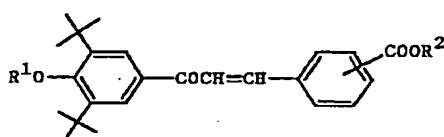


(式中、R¹およびR²は同一または異なる水素原子または炭素原子数1~5のアルキル基を示す。)で表される安息香酸誘導体およびその塩。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式



(式中、R¹およびR²は同一または異なって水素原子または炭素原子数1～5のアルキル基を示す。)で表される安息香酸誘導体およびその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は悪性腫瘍増殖の予防および治療に有用な安息香酸誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術】ビタミンA酸およびその類縁体は、悪性腫瘍増殖の予防および治療ならびに座瘡、乾癬および他の皮膚疾患の治療に用いられ、全身または局所的に使用できる。ドイツ特許第3434948号、同第3434942号、ヨーロッパ特許第2210118号およびH. KagechikaらのJ. Med. Chem., 第31巻、第2182～2192頁(1988年)には、芳香環が置換したビニレン基、アミド結合、アゾ結合、ケテン結合等により芳香族カルボン酸またはカルボン酸と連結した化合物が、細胞分化誘導および皮膚疾患の予防と治療の作用を持っていることが記載されている。また、ヨーロッパ特許第212848号、同第211548号およびShudoらのChem. Pharm. Bull., 第34巻、第121頁(1986年)は、ジ-tert-ブチルフェニル基を有する化合物類を開示し、それらが喘息、アレルギーおよび乾癬等の治療に有用であるとしている。しかしながら、今までに報告された化合物は、細胞分化誘導などの作用が十分でなくビタミンA過剰症など毒性が強いため、臨床応用には至らなかつた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来に比べ優れた抗腫瘍作用および分化誘導作用を有する化合物を提供することにある。

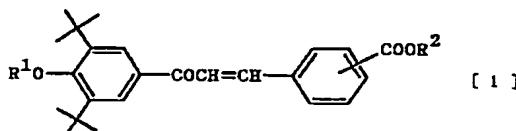
【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記目的に鑑み鋭意検討した結果、新たに合成した化合物が上記目的を達成できることを見出し、本発明を完成した。

【0005】本発明は、下記式[1]

【0006】

2



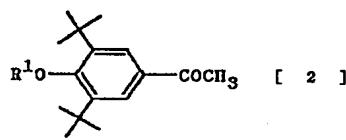
【0007】(式中、R¹およびR²は同一または異なる水素原子または炭素原子数1～5のアルキル基を示す。)で表される安息香酸誘導体およびその塩である。

10 【0008】本発明において、アルキル基とは直鎖状または分枝鎖状のアルキル基であり、たとえばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、ベンチル基などである。また、本発明に係る化合物の塩とは薬理学的に許容されるものを意味し、たとえばカリウム、ナトリウム、マグネシウム、アンモニアなどの無機塩基またはトリエチルアミンなどの有機塩基との塩が挙げられる。

【0009】本発明の化合物は、式[2]

【0010】

20



【0011】(式中、R¹は前記と同意義である。)で表されるアセトフェノン酸誘導体と下記式[3]

【0012】

30



【0013】(式中、R²は前記と同意義である。)で表されるホルミル誘導体とを水酸化バリウムの存在下反応させて製造することができる。

【0014】本発明化合物の投与方法としては非経口投与、経口投与が挙げられる。その投与剤形は、非経口投与の場合は注射剤であり、経口投与の場合には錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、シロップ剤、懸濁剤から選ばれるいずれか一つの剤形である。これらの投与剤形は、患者の症状、年齢および治療の目的に応じて適宜選択することができる。各種剤形の製剤の製造においては、常用の賦形剤(たとえば、結晶セルロース、デンプン、乳糖、マンニトールなど)、結合剤(たとえば、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドンなど)、滑沢剤(たとえば、ステアリン酸マグネシウム、タルクなど)、崩壊剤(たとえば、カルボキシメチルセルロースカルシウムなど)などを用いることができ、通常の製造法(たとえば、第12改正日本薬局方に規定する方法)を用いることができる。

【0015】投与量は、成人を治療する場合で0.1～500mgであり、これを1日1～3回に分けて投与す

る。この投与量は、患者の年齢、体重および症状によって適宜増減することができる。

【0016】

【発明の効果】本発明の化合物は、抗腫瘍作用および分化誘導作用を有するため悪性腫瘍増殖の予防および治療に有用である。

【0017】

【実施例】以下、実施例および試験例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

実施例1

3, 5-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシアセトフェノン4.5g (18.3mmol) および4-ホルミル安息香酸メチルを100mlの無水エタノールに溶かし、乾燥した水酸化バリウムを6g加え、攪拌しながら10時間加熱還流した。反応液を冷却後、水酸化ナトリウム2gを20mlの水に溶かした溶液を加え、攪拌しながら2時間加熱還流した。反応液を冷却後、塩酸でpH5~6に調製し、減圧下エタノールを留去した。残渣に100mlの水を加えて十分に攪拌し、固体を濾取し、乾燥後エタノールで結晶させ、淡黄色結晶の4-[3-(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-1-プロペニル]安息香酸4.5gを得た。

【0018】mp 222~224°C

元素分析: C₂₄H₂₈O₄=380.46

計算値(%): C 75.75, H 7.42

実測値(%): C 75.73, H 7.38

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.42 (s, 18H, t-Bu), 7.52~8.00 (m, 8H, Ar-H)

MS m/e:

380 (M⁺, 30), 365 (M⁺-CH₃, 100), 233 (6)

IR (KBr) ν (cm⁻¹):

3620, 2960, 1780, 1755, 1605, 1570, 1420, 1320, 1290, 1210, 845, 780

【0019】実施例2

3, 5-ジ-*t*-ブチル-4-メトキシアセトフェノン3.0g (11mmol) および4-ホルミル安息香酸メチル1.88g (11mmol) を40mlの無水メタノールおよび5mlの20%ナトリウムメトキシド溶液に加え、室温で4時間攪拌後、一夜放置した。反応液に水10mlを加えて室温で一夜攪拌した。塩酸でpH7にしてから減圧下で大部分のメタノールを留去し、再び塩酸でpH2~3にして析出した固体を濾取し、エタノールで再結晶して4-[3-(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-メトキシフェニル)-3-オキソ-1-プロペニル]安息香酸3.8gを得た。

【0020】mp 192~194°C

元素分析: C₂₅H₃₀N₂O₄=394.49

計算値(%): C 76.11, H 7.67

実測値(%): C 75.75, H 7.59

MS m/e: 394 (M⁺, 10), 378 (12), 261 (50), 247 (100), 149 (99)

【0021】実施例3

実施例1と同様に、3, 5-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシアセトフェノン0.65g (2.62mmol)

10 および2-ホルミル安息香酸メチル0.43g (2.62mmol) から2-[3-(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)-3-オキソ-1-プロペニル]安息香酸の粗生性物0.89gを得、これをエタノールで結晶化させて黄色結晶0.72gを得た。

【0022】mp 105~106°C

元素分析: C₂₄H₂₈O₄=380.46

計算値(%): C 75.75, H 7.42

実測値(%): C 75.60, H 6.93

¹H-NMR (DMSO-d₆) δ ppm: 1.40

20 (s, 18H, t-Bu), 5.38, 6.06 (m, 2H, CH=CH), 7.68 (m, 6H, Ar-H)

MS m/e: 380 (M⁺, 67), 233 (100)

IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3590, 2960, 2910, 1760, 1660, 1585, 1420, 1350, 1230, 880, 780, 745

【0023】

【0024】試験例1 [各種癌細胞増殖阻害作用]

マウスP388白血病細胞 (20000cells/m²)

30 1)、ヒト鼻咽頭癌KB細胞 (10000cells/m²)、ヒト小細胞肺癌H69細胞 (50000cells/m²)、ヒト卵巣癌A2780細胞 (20000cells/m²) またはヒト膀胱癌HT1197細胞 (30000cells/m²) を10%ウシ胎児血清含有RPMI-1640培養液またはMEM培養液に懸濁後、その0.1mlを96穴の培養用プレートに添加し、37°C、5%炭酸ガス培養器中で24時間培養した。最終0.5%のDMSOで溶解した種々濃度の実施例2で得られた化合物を0.1ml添加し、更に48、

40 72、120、72または96時間培養した。培養後、PBSに溶解したMTT [3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド] 試薬を添加し更に4時間培養した。培養終了後、培地を除去し、DMSO 150μlを加え、イムノリーダーNJ2000で540nmの吸光度を測定した。コントロールの吸光度に対する薬物処理群の吸光度の比を求め、Probit法により50%阻害濃度 (IC₅₀) を計算した。結果を表1に示した。

【0025】

	$IC_{50} (\mu g/ml)$
P 3 8 8	6. 2 2
K 8	3. 8 0
H 8 9	2. 0 8
A 2 7 8 0	4. 4 2
H T 1 1 9 7	2. 3 0

【0026】試験例2 [マウス大腸癌Colon 26のin vivoでの増殖に対する作用]

2. 5×10^6 cells/mlに調製したColon 26の細胞浮遊液0. 2 mlをCDF1マウス背部皮下に移植した。実施例2で得られた化合物は5%アラビアゴムに懸濁し、移植後3日目より1日置きに4回経口投与した。移植後10日目に腫瘍の大きさを測定し、以下の式により腫瘍体積を算出した。

【0027】

【数1】

$$\text{腫瘍体積} = \frac{(\text{長辺}) \times (\text{短辺})^2}{2}$$

【0028】コントロールに対する薬物投与群の腫瘍体積の割合から抑制率を算出し、表2に示した。

【0029】

【表2】

投与量 (mg/kg)	抑制率 (%)
1. 8	15. 2
3. 1 3	- 11. 3
8. 2 5	42. 8
12. 5	20. 2
25	54. 2 **

**: $p < 0. 05$

【0030】試験例3 [ラット軟骨肉腫のin vivoでの増殖に対する作用]

無菌条件下で採取した肉腫細胞をラット腋窩部皮下に移植した。翌日より各濃度の実施例2で得られた化合物を1日おきに4回経口投与した。移植後10日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定して抑制率を算出した。結果を表3に示した。

【0031】

【表3】

投与量 (mg/kg)	抑制率 (%)
0. 8	95. 5
1. 2	99. 3

【0032】試験例4 [マウスLewis肺癌のin vivoでの増殖に対する作用]

無菌条件下で採取した肺癌細胞をマウス腋窩部皮下に移植した。翌日より各濃度の実施例2で得られた化合物を1日おきに4回経口投与した。移植後10日目に腫瘍を

6
摘出し、腫瘍重量を測定して抑制率を算出した。結果を表4に示した。

【0033】

【表4】

投与量 (mg/kg)	抑制率 (%)
6. 8	48. 8
11. 8	68. 7

10 【0034】試験例5 [マウスB16メラノーマのin vivoでの増殖に対する作用]

無菌条件下で採取したメラノーマ細胞をマウス腋窩部皮下に移植した。翌日より各濃度の実施例2で得られた化合物を1日おきに3回経口投与した。移植後10日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定して抑制率を算出した。結果を表5に示した。

【0035】

【表5】

投与量 (mg/kg)	抑制率 (%)
1	20. 9
5	58. 9 **

**: $p < 0. 01$

【0036】試験例6 [マウスS180肉腫のin vivoでの増殖に対する作用]

無菌条件下で採取した肉腫細胞をマウス腋窩部皮下に移植した。翌日より各濃度の実施例2で得られた化合物を1日おきに3回経口投与した。移植後10日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定して抑制率を算出した。結果を表6に示した。

【0037】

【表6】

投与量 (mg/kg)	抑制率 (%)
6. 8	32. 8 **
11. 8	38. 5 **

**: $p < 0. 01$

40 【0038】試験例7 [M5076肉腫移植マウスの生存期間に対する作用]

無菌条件下で採取した肉腫細胞をマウス腋窩部皮下に移植した。翌日より各濃度の実施例2で得られた化合物を1日おきに4回経口投与した。各投与マウスの生存期間を測定し、コントロールに対する薬物投与群の延命効果T/C%を以下の式により算出した。結果を表7に示した。

【0039】

【数2】

$$T/CX = \frac{\text{薬物投与群の平均生存日数}}{\text{コントロール群の平均生存日数}} \times 100$$

【0040】

【表7】

投与量 (mg/kg)	平均生存日数	T/CX
0	16.8	-
1	18.1	-
5	22.1	131.5
10	7.8	-

【0041】試験例8 [分化誘導活性]

コリンズらの方法 (Cancer Res., 第42巻, 第445~449頁, 1982年) に従って行った。HL-60細胞 1×10^5 個/mlを10%の牛胎仔血清添加 RPMI-1640培地、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、37°C、5%CO₂で培養した。実施例1で得られた化合物およびオールトランスビタミンA酸は1%および0.1%のエタノール溶液とし、対照としては0.1%のエタノール溶液を用いた。培養開始時に、薬剤をそれぞれの濃度になるように添加し、5日間培養後、NBT還元能を指標として分化誘導活性を測定した。すなわち、培養終了後、細胞を1000rpmで遠心分離して回収し、0.1%NBT溶液0.5mlと12-O-テトラデカノイルフォルボール-13-アセテート (TPA) 200ngを加え、37°Cで60分間反応させた。反応後の細胞を遠心分離して集め、塗沫標本を作製、Wright-Giemsa染色液で染色した。顕微鏡下で1検体につき200個の細胞を観察し、その内細胞質に青紫色のホルマザン沈殿のあるものをNBT還元能陽性細胞とした。

【0042】その結果、ネガティブコントロール群では100%の細胞が未熟な細胞であり、ポジティブコントロールのビタミンA酸では $1 \times 10^{-6}\text{M}$ での分化率が95~100%であり、本発明に係る化合物の50%分化率 (EC₅₀) は $7.1 \times 10^{-7}\text{M}$ であった。

【0043】試験例9 [癌遺伝子の発現に対するin vitro試験]

既知の方法 (Y. Lu et al., J. Biol. Chem., 第263巻, 第4891~4894頁, 1988年) に従い、無菌条件下で10%の牛胎仔血清添加 RPMI-1640培地、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5%CO₂、37°Cで培養したHL-60細胞に異なる濃度の実施例1で得られた化合物で処理した。2、6および12時間後にそれぞれ細胞を採取し、その細胞をイソチオシアニン酸

グアニジン (GIT) 溶液 [6Mイソチオシアニン酸グアニジン、10mMクエン酸ナトリウム (pH 7)、0.5%ザルコシリ、0.1M2-メルカプトエタノール] に懸濁させ、振盪して細胞を破壊した。5.7M塩化セシウム-0.1MEDTA-Na (pH 7.5) に上記細胞ライゼートを重層し、174000G、20°Cで16時間密度勾配遠心をした。無色透明な沈殿を全RNAとし、それをDEPCで処理した水の中に溶解させ、65°Cで変性後、0.1igo-dTセルロースカラムを通して緩衝溶液でOD (260nm) が0になるまで洗浄してからmRNAを溶出した。それをエタノールで沈殿させた後DMSOで変性させ、1%アガロースゲル電気泳動して、Northern転移法でmRNAをナイロン膜上に固定した。ニックトランスレーションでDNAプローブを標識した。³²Pで標識したプローブをmRNAに結合させ、オートラジオグラフィー法で癌遺伝子の発現状態を測定した。

【0044】その結果を図1に示した。本発明化合物がコントロールと比較して癌遺伝子発現を顕著に抑制することが判明した。

【0045】試験例10

マウス骨髄細胞を用いた小核形成試験により、本発明化合物の抗突然変異作用を評価した。小核形成はシクロフォスファミド、DMBAにより誘導し、本発明に係る化合物の拮抗作用を観察した。体重18~22gのマウスを1群5匹とし、実施例1で得られた化合物 50mg/kgまたは100mg/kgを経口で1日1回4日間連続投与した。4日目の投与終了後、シクロフォスファミド 100mg/kgまたはDMBA 25mg/kgを腹腔内注射して小核形成誘導し、24時間後常法により小核試験を行った。表8および9に示されるように、本発明化合物は陽性対照群に比較し小核形成が有意に抑制された。

【0046】

【表8】

群	
未処理群（陰性対照群）	2. 6 ± 1. 1
小核形成誘発群（陽性対照群）	22. 0 ± 3. 4
本発明群	
100 mg/kg	11. 8 ± 2. 5 **
50 mg/kg	15. 2 ± 4. 3 *

(注) 数値は骨髓細胞500個当たりの小核形成細胞数を示す
(mean ± SD)

**: P < 0.01 *: P < 0.05

【0047】

【表9】

群	
未処理群（陰性対照群）	2. 0 ± 1. 0
小核形成誘発群（陽性対照群）	18. 0 ± 3. 8
本発明群	
100 mg/kg	7. 0 ± 2. 7 **
50 mg/kg	7. 2 ± 2. 8 **

(注) 数値は骨髓細胞500個当たりの小核形成細胞数を示す
(mean ± SD)

**: P < 0.01

【0048】試験例11 [マウス耳介腫脹モデルを用いた抗プロモーター作用]

ヘッカーラの方法 (Nature reprints, 第54巻, 第282頁, 1967年) に従って行った。

【0049】体重18~22gのマウスを無作意にグループわけし、1群7匹とした。実施例1で得られた化合物50mg/kgまたは100mg/kgを経口で1日1回4日間連続投与し、クロトン油を塗布後両耳に孔を開けた。塗布した耳と塗布しない耳の腫脹の差を指標とした。

【0050】その結果、対照群の両耳の腫脹の差は25.3±3.4mg (P<0.05) で、本発明化合物群の場合は20.8mg±4.8mg (50mg/kg) と19.9±3.9mg (100mg/kg) (P<0.05) であった。従って、本発明化合物がマウスの耳介腫脅に対する抑制作用を持っていると判断した。

【0051】試験例12 [ラットの軟骨肉腫モデルを用いた腫瘍成長に対する作用]

軟骨肉腫 (1:3希釈液、0.5ml/匹) をラットの皮下に接種後、2日毎に胃に直接投与法で実施例1で得られた化合物5mg/kgまたは10mg/kgを9週間連投した。7週目にラットの腫瘍の重さを測定した結果、5mg/kgと10mg/kgはそれぞれ対照群に対する腫瘍抑制率が98.7%, 100%であった。この結果は本発明化合物がラット可移植性軟骨肉腫に対し

て顕著な抑制作用を有することを示した。

【0052】試験例13

DMBAおよびクロトン油によるマウス皮膚乳頭腫をモデルとして使用し、本発明に係る化合物の化学発ガン物質に対する拮抗作用を評価した。

【0053】体重18~22gのマウスを無作意に1群30匹3群にわけ、8%硫化ナトリウム水溶液で背部脱毛した。1週間飼育後、脱毛したところに1回につき150ng DMBAを含んだ0.2mlのジメチルベンゾアントラセンーアセトン溶液を塗布し、週2回で2週間投与した。3週間目から0.25%クロトン油-アセトン溶液を0.2ml/回塗布し、週2回で12週間投与した。DMBAを塗布し始めた第1週から50mg/kg、25mg/kgで実施例1で得られた化合物をマウスの背部に直接投与した。本発明化合物を2日毎に1回、12週間投与し、各週の乳頭腫が発現した動物数と各々の動物に発現した腫瘍数を記録した。

【0054】その結果、本発明化合物はコントロールと比較して顕著な抑制作用を有し、その活性は投与依存的であった(図2)。

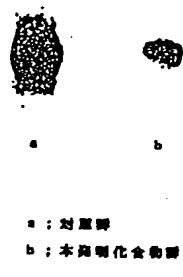
【0055】

【図面の簡単な説明】

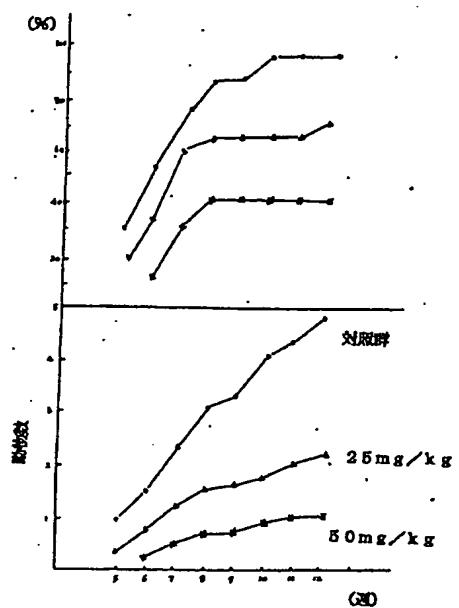
【図1】試験例9におけるオートラジオグラフィー法での癌遺伝子の発現状態を示す。

【図2】試験例13における試験結果を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの焼き

(72)発明者 ▼チュー▲ 凤鳴
中華人民共和国北京市宣武区先農壇街1号
中国医学科学院药物研究所内
(72)発明者 何 晓慶
中華人民共和国北京市宣武区先農壇街1号
中国医学科学院药物研究所内

(72)発明者 夏 麗娟
中華人民共和国北京市宣武区先農壇街1号
中国医学科学院药物研究所内
(72)発明者 亀尾 一弥
東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内
(72)発明者 中池 司郎
東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内